

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Sampel, Alat dan Bahan**

##### **3.1.1 Sampel**

Jamur *Aspergillus oryzae* yang digunakan dalam penelitian ini dibiakkan dari isolat murni *Aspergillus oryzae* 6004 yang didapat dari laboratorium Mikrobiologi PAU UGM Yogyakarta.

Sampel Kulit Kaki Ayam Broiler yang digunakan diambil dari pedagang daging di pasar Pakem Yogyakarta.

##### **3.1.2 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Sentrifuge ( Fisher Scientific 228)
2. Autoklaf ( Prestige Medical Series 21000)
3. Inkubator (Memmert)
4. Lemari pendingin (Sharp)
5. Shaker ( Tungtec TS – 330 A)
6. Spektrofotometer (Shimadzu-1201)
7. Timbangan elektrik (Mettler AT 200)
8. pH - meter (Orion-420 A)
9. Kompor listrik (Masphion)
10. Gunting
11. Ember
12. Erlenmeyer

13. Labu Kjeldahl

14. Labu destilasi

15. Buret

16. Drum putar

17. Kertas pH

### 3.1.3 Bahan

1. Biakan murni *Aspergillus oryzae*

2. Kentang

3. Tepung agar

4. Dedak

5. Dekstrosa

6. Tepung kedelai

7. Folin ciocalteau fenol

8. Bufer fosfat

9. Natrium hidroksida

10. Selofan

11. Kasein

12. Asam klorida

13. L- Tirosin

14. Asam Trikloroasetat

15. Barium klorida

16. Aquadest

17. Tween

18. Natrium Sulfida

19. Amonium sulfat



20. Kalsium hidroksida
21. Natrium klorida
22. Asam sulfat
23. Tepol
24. Asam formiat
25. Kalium sulfat
26. Kupri sulfat pentahidroksida
27. Merkuri oksida
28. Natrium tiosulfat
29. Asam borat
30. "Bromo Creasal Green"
31. Dinatrium hidrofوسفat
32. Natrium dihidrofوسفat
33. Merah metil

### **3.2 Variabel Eksperimen**

#### **3.2.1 Variabel yang diukur**

- Kadar N total kulit

#### **3.2.2 Variabel bebas**

- Konsentrasi enzim protease
- Waktu bating

#### **3.2.3 Variabel yang dikonstankan**

- Temperatur
- PH



### 3.3 Cara Kerja

#### 3.3.1 Preparasi Larutan

a. Pembuatan PDA ("Potato Dextrose Agar")

Kentang kupas sebanyak 200 g dipotong kecil-kecil dimasukkan dalam aquades 1000 mL. Didihkan selama 1 jam lalu saring dengan kapas. Tambahkan aquades sampai dengan volume semula (1000 mL). Masukkan 15 g agar dan 20 g dekstrosa, panaskan dan aduk sampai larut. pH diatur sampai 5. Sterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

b. Pembuatan Media Fermentasi

Dedak, tepung kedelai dan aquades dicampur dengan perbandingan (7:3:20), sterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

c. Larutan Tween 80 0,1%

Tween 80 sebanyak 1 mL dilarutkan dalam aquades hingga volume 1 L.

d. Bufer Fosfat 0,2 M pH 7,5

Larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M sebanyak 16 mL ditambah 84 mL larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M dilarutkan dalam aquades hingga volume 200 mL.

e. Bufer Fosfat 0,002 M pH 7,5

Larutan bufer fosfat 0,2 M pH 7,5 sebanyak 1 mL dilarutkan dalam aquades hingga volume menjadi 100 mL.

f. Larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M

Sebanyak 27,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  kristal dilarutkan dengan aquades hingga 1000 mL.

g. Larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M

Sebanyak 52,65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  kristal atau 71,7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  kristal dilarutkan dalam aquades hingga volume 1000 mL.

h. Larutan  $\text{BaCl}_2$  0,01 M

Sebanyak 0,2083 g  $\text{BaCl}_2$  dilarutkan dalam aquades hingga 100 mL.

i. Larutan TCA 30%

Sebanyak 30 g TCA dilarutkan dalam aquades hingga 100 mL

j. Reagen Lowry

- Lowry A

Sebanyak 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ditambah 2 g NaOH dan 0,2 g Natrium Kalium Tartrat dilarutkan dalam aquades hingga volumenya 500 mL.

- Lowry B

Sebanyak 0,6 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL.

- Lowry C

Lowry A sebanyak 50 bagian ditambah 1 bagian Lowry B

- Lowry D

Folin ciocalteu fenol 1 bagian ditambah aquades 1 bagian

k. Pembuatan Substrat Kasein

Kasein sebanyak 1,2 g dilarutkan dalam aquades hingga volumenya 100 mL.

l. Pembuatan Standar Kasein

Kasein 0,03 g dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 100 mL (konsentrasi  $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (300, 240, 180, 120, dan  $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

m. Pembuatan Standar Tirosin

Tirosin sebanyak 0,005 g dilarutkan dalam aquades hingga volumenya menjadi 25 mL. Untuk membuat variasi konsentrasi dilakukan pengenceran (200, 150, 100, 50  $\mu$ g. mL<sup>-1</sup>)

n. Larutan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4%

40 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dilarutkan dalam 1000 mL aquades

o. Pembuatan Larutan HCl 0,2 N

Sebanyak 18 mL HCl pekat diencerkan dengan aquades menjadi 1000 mL

p. Pembuatan Larutan NaOH 40%

Sebanyak 400 g NaOH dilarutkan dalam 1000 mL aquades

### 3.3.2 Pembiakan *Aspergillus oryzae*

Biakan murni *Aspergillus oryzae* ditumbuhkan pada media PDA steril dengan menggunakan jarum ose. Diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. Hasil pembiakan dipindahkan ke media fermentasi, diinkubasi pada suhu kamar dengan waktu pertumbuhan optimal 72 jam.

### 3.3.3 Isolasi Enzim Protease

#### 3.3.3.1 Ekstraksi

Enzim diekstraksi dari media fermentasi dengan larutan 0,1% Tween 80 sebanyak 20 mL, disheker selama 1 jam kemudian ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 3400 rpm selama 3,5 menit. Supernatan merupakan enzim kasar.

### **3.3.3.2 Presipitasi**

Pemisahan protein enzim dari hasil ekstraksi dilakukan dengan penambahan amonium sulfat secara bertingkat. Amonium Sulfat yang telah ditimbang sesuai dengan fraksi yang dikehendaki (0-10%) – tabel - dimasukkan ke dalam enzim kasar sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam penangas es. Campuran didiamkan dalam keadaan dingin, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 42 menit. Endapan dipisahkan dan disuspensikan dengan bufer fosfat 0,2 M pH 7,5. Endapan tersebut merupakan fraksi 0-10%. Supernatan diperlakukan sama dengan diatas hingga didapatkan fraksi-fraksi dengan tingkat kejenuhan tertentu.

### **3.3.3.3 Dialisis**

Dialisis dilakukan dengan menggunakan selofan yang telah direbus dalam aquades selama 30 menit. Selofan yang berisi enzim direndam dalam bufer fosfat 0,002 M pH 7,5 dalam keadaan dingin. Bufer diaduk dengan pengaduk magnetik dan diganti tiap 2 jam sekali. Bufer yang diganti diuji kandungan amonium sulfatnya dengan penambahan  $\text{BaCl}_2$  hingga tidak terbentuk endapan.

### **3.3.4 Uji Aktivitas Enzim**

Larutan substrat kasein sebanyak 1 mL ditambah larutan enzim sebanyak 0,3 mL, diinkubasi pada suhu 33 °C selama 15 menit. Kemudian ditambah larutan TCA 30% sebanyak 3 mL, dikocok dan dibiarkan 30 menit dalam inkubator pada suhu 33 °C. Untuk memisahkan endapan, campuran disentrifugasi pada 5000 rpm selama 30 menit. Supernatan dibaca serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dari tirosin. Sebagai kontrol adalah

campuran substrat, TCA, dan enzim yang telah dimatikan (tidak memiliki aktivitas). Aktivitas enzim dicari secara regresi linier terhadap kurva standar tirosin.

### **3.3.5 Penentuan Kurva Standar Tirosin**

Tirosin dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum tirosin dengan alat spektrofotometer.

### **3.3.6 Penentuan Kadar Protein Enzim**

Larutan enzim sebanyak 0,6 mL ditambah 3 mL larutan Lowry C, dibiarkan selama 20 menit dalam suhu kamar. Tambahkan 0,3 mL larutan folin dengan cepat dan biarkan kembali selama 45 menit pada suhu kamar sambil sesekali dikocok. Larutan dibaca serapannya pada panjang gelombang dari kasein dengan spektrofotometer. Kadar protein enzim ditentukan secara regresi linier terhadap kurva standar kasein.

### **3.3.7 Penentuan Kurva Standar Kasein**

Kasein dalam berbagai konsentrasi dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum kasein dengan alat spektrofotometer.

### **3.3.8 Pemanfaatan Enzim sebagai Agensia Bating**

#### **- Pencucian dan penimbangan**

Kulit kaki ayam dicuci sampai bersih dengan air mengalir kemudian ditimbang.



- **Pelepasan Sisik dan Daging**

Kulit kaki ayam dimasukkan dalam wadah atau ember kemudian ditambah 2 L air dan 30 g  $\text{Na}_2\text{S}$  kemudian diremas-remas selama 10 menit dan didiamkan 30 menit, diulang kembali sampai sisik terlepas. Ditambah 2% kapur dan 100% air diamkan 1 malam. Kulit dicuci sampai bersih kemudian dihilangkan dagingnya dengan pisau seset. Setelah itu dicuci dan ditimbang kembali.

- **Pengapuran**

Ditambahkan 2%  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dan 300% air ke dalam kulit, didiamkan semalam dan dicuci sampai bersih

- **Pembuangan Kapur**

Kulit dimasukkan ke dalam 200% air, 2%  $\text{NH}_2(\text{SO}_4)_2$ , 0,5% Tepol, kemudian diputar dalam drum putar selama 60 menit.

- **Bating**

Kulit dalam larutan pembuangan kapur 200% ditambah enzim protease dari *Aspergillus oryzae* dengan variasi konsentrasi 0,5%, 1,0% dan 1,5% dengan waktu bating 30, 60 dan 90 menit.

- **Pengasaman**

Kulit diputar dalam drum putar kemudian ditambah 0,5% asam formiat diencerkan (1:10), 1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 150% air dan 10% NaCl sampai didapatkan pH 3,5.

### 3.3.9 Uji Kadar Protein pada Kulit (Metode Kjeldahl)

#### - Destruksi

Ditimbang 0,1-0,5 g sampel kulit dimasukkan dalam labu Kjeldahl, ditambah katalisator yang terdiri dari 0,99g  $K_2SO_4$ , 0,8 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 4,1 g  $HgO$  dan 2 mL  $H_2SO_4$ , campuran didestruksi selama 1 jam sampai larutan jernih.

#### - Destilasi

Hasil destruksi kemudian ditambah 100 mL air dan 8 mL campuran 40 g NaOH dan 5 g  $Na_2S_2O_3$  yang sebelumnya dilarutkan dengan aquades hingga volume 100 mL. Destilasi dilakukan selama 15 menit. Destilat ditampung dengan erlenmeyer yang berisi 5 mL asam Borat, indikator merah metil dan "Bromo Creasol Green".

#### - Titrasi

Destilat dititrasi dengan 0,02 N HCl hingga terjadi perubahan warna dari hijau kebiruan menjadi merah ungu.

